AUS DEM
HYGIENISCH-BAKTERIOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BERN
(DIREKTOR: Prof. Dr. C. HALLAUER)

ÜBER DIE GEWÖHNUNG VON PNEUMOCOCCEN AN SULFONAMIDE

(ULIRON, DAGÉNAN, CIBAZOL)

IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG
DER WÜRDE EINES DOCTOR MEDICINAE DENTIUM
DER UNIVERSITÄT BERN

VORGELEGT VON

HANS JEGER
AUS BREITENBACH (SOL.)

Buchdruckerei Vogt-Schild A.-G., Solothurn
1942

Auf Antrag des Herrn Professor Dr. C. Hallauer von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 15. Juli 1942.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:
i. V. BLUNTSCHLI,
Prodekan.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547623_0050

Einleitung

Die erworbene Resistenz von Mikroorganismen gegenüber chemischen Agenzien bildete bereits das Thema zahlreicher Untersuchungen. Die ersten Arbeiten, die sich mit der Gewöhnung von Trypanosomen, Paramaezien und Hefen an Farbstoffe und bestimmte Chininderivate beschäftigten, waren bald von entsprechenden Versuchen mit Spirochaeten, Spirillen, Salmonellen, Choleravibrionen und Pneumococcen gefolgt. Von einer geschichtlichen Uebersicht dieser sehr zahlreichen Versuche soll hier abgesehen werden, dagegen erscheint es angezeigt, an die bisherigen Beobachtungen und Erkenntnisse derartiger Festigungsversuche zu erinnern und zu untersuchen, ob sich unter Verwendung neuzeitlicher, antibakteriell wirksamer Chemotherapeutica ähnliche Verhältnisse aufdecken lassen.

Die bisher festgestellten biologischen Veränderungen von Bakterien bei der Angewöhnung an bestimmte Pharmaka lassen sich in den Rahmen der allgemeinen Variabilität von Mikroorganismen einordnen. Das Erscheinen neuer Merkmale erfolgt bekanntlich entweder langsam und sukzessiv oder sprunghaft und plötzlich («Chemoflexion» von *Morgenroth* [11]), wobei Erscheinungen vorausgehen oder nachfolgen, die *Richet, Bachrach* und *Cardot* [7, 8] als der Anaphylaxie nahestehend betrachtet haben. Nach Ausschaltung der äussern Reizwirkung kann die Bildung von Varianten sofort verloren gehen, oder die gebildeten Varianten verschwinden erst später, allmählich oder plötzlich, oder sie bleiben schliesslich als Dauermodifikationen bestehen. Fernerhin muss zwischen wahrer und scheinbarer Festigung unterschieden werden. Bei der eigentlichen Festigung findet eine beträchtliche Umstimmung biologischer Eigenschaften der Mikroorganismen (*Gotschlich* [12]), die aber allerdings die ursprünglich vorhandenen Keimmerkmale nicht auszulösen vermag, statt; bei der scheinbaren Festigung handelt es sich dagegen lediglich um eine Auslese a priori resistenter Keime innerhalb einer Bakterienpopulation.

Die Festigungsmöglichkeit einer Keimart gegenüber einem bestimmten Chemotherapeuticum hat selbstverständlich auch eine grosse praktische Bedeutung. Liegt nämlich der Fall vor, dass ein Infektionserreger sich leicht und rasch an ein Chemotherapeuticum gewöhnt und demzufolge resistent wird, so kann nur eine massive «Stosstherapie» Erfolg, d. h. eine Sterilisatio magna

im *Ehrlich*schen Sinne bewirken. Eine bereits durch die Therapie erzielte Chemoresistenz muss allerdings nicht unbedingt endgültig sein; so wurde bekanntlich nachgewiesen, dass im menschlichen Organismus chininresistent gewordene Malariaplasmodien durch Salvarsanbehandlung ihre ursprüngliche Chininempfindlichkeit wiedergewinnen.

Die chemotherapeutischen Mittel aus der Gruppe der *Sulfonilamide* werden nun ebenfalls in Form einer Stosstherapie angewendet. Massgebend hierfür war wohl in erster Linie die klinische Beobachtung, dass sich hierdurch der Infektionsprozess am leichtesten coupieren und sich die Gefahr von Recidiven wesentlich einschränken lassen, dann aber auch sicher die Befürchtung, dass eine verzettelte Dosierung leicht eine Festigung des Infektionserregers zur Folge haben könnte. Tatsächlich liegen auch bereits eine Reihe von experimentellen Befunden und klinischen Beobachtungen, welche auf die Möglichkeit einer Gewöhnung von Infektionserregern an Sulfonamidpräparate hinweisen, vor. So wurde von *Felke* [13, 14], *Miescher* und *Schnetz* [15], *Spitzer* [16], *Westphal, Charles* und *Carpenter* [21] der Nachweis geleistet, dass Gonococcen in vitro und in vivo gegenüber Sulfonilamiden leicht tolorant werden und die einmal erlangte Festigung über 20 Passagen auf sulfonamidfreien Nährböden beibehalten. *Miescher* und *Schnetz* machten fernerhin die Beobachtung, dass ein an Sulfathiazol gewöhnter Gonococcenstamm auch gegen andere Sulfonamidderivate eine ausgesprochene Resistenz aufweist. *Ross* [17] berichtete im Jahre 1939 über einen Fall von Pneumococcenmeningitis mit tödlichem Ausgang; die Therapie bestand in der Verabreichung von insgesamt 28,5 g Sulfapyridin (M und B 693) innerhalb von vier Tagen, nämlich 2 g am ersten, 10,5 g am zweiten und 16 g auf den dritten und vierten Tag verteilt. Die bakteriologische Untersuchung des Liquors ergab eine positive Kultur von Pneumococcen Typus I bei einem Sulfapyridingehalt des Liquors von 6 mg/% am dritten, 32 mg/% am vierten und 33 mg/% am fünften Tag. Die schliesslich isolierten Pneumococcen zeigten im Reagenzglasversuch eine wesentliche gesteigerte Toleranz gegenüber dem verwendeten Medikament, dagegen dieselbe Virulenz für die weisse Maus wie der zu Beginn isolierte Stamm. *Mac Leod* und *Daddi* [18] versuchten die Gewöhnung eines Pneumococcenstammes vom Typus I an Sulfapyridin in vitro; während der verwendete Stamm zu Beginn gerade noch bei einer Sulfapyridinkonzentration von 1 : 160'000 gezüchtet werden konnte, wurde nach 33 Gewöhnungspassagen bereits eine Sulfapyridinkonzentration von 1 : 16'000 vertragen. Der gefestigte Stamm zeigte hinsichtlich seiner Färbbarkeit nach Gram, seinem kulturellen Verhalten und seiner Mäusevirulenz keine Abweichungen. Auch in immunologischer Hinsicht wurde keine Veränderung beobachtet; die Quellungsreaktion blieb typspezifisch und Mäuse liessen sich

passiv und aktiv (mit dem Originalstamm) gegen den gefestigten Stamm zuverlässig immunisieren. Die einmal erreichte Festigung erwies sich insofern als dauerhaft, als 30 Passagen auf Sulfapyridin-freier Nährbouillon und 10 Passagen auf nicht vorbehandelten Mäusen keinen Resistenzverlust zur Folge hatten. *Mac Leod* [19] stellte fernerhin fest, dass die Festigung gegen Sulfapyridin auf die Aktivität der Dehydrogenase von Einfluss ist. Schliesslich berichteten *Schmidt, Claugus und Effie Starkes* [20], dass gegen Sulfapyridin gefestigte Pneumococcen des Typus I und II auch gegen Sulfathiazol und Sulfamethylthiazol resistent sind, woraus die praktische Schlussfolgerung abgeleitet wird, dass die chemotherapeutische Behandlung mit mehreren Sulfonamidpräparaten das Risiko der Keimfestigung nicht zu beheben vermag.

Versuche

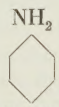
Mit den zu Beginn meiner Versuche noch nicht veröffentlichten Arbeiten von *Mac Leod und Daddi* und *Schmidt, Claugus und Starkes* stehen die von mir durchgeführten Untersuchungen zwar hinsichtlich der Fragestellung und teilweise auch der Ergebnisse in weitgehender Analogie; die eingeschlagenen Methoden, die ausgedehnte Dauer der Versuche und die Art der verwendeten Chemotherapeutica bewahren dagegen meinen Versuchen den Wert ihrer ursprünglichen Originalität und rechtfertigen wohl auch deren Veröffentlichung.

In den Versuchen, über die im folgenden berichtet werden soll, wurden drei Pneumococcenstämme vom Typus I, II und III auf ihre Festigung, Entfestigung und gekreuzte Resistenz gegenüber drei Sulfonamidderivaten, nämlich Sulfathiazol, Sulfapyridin und Uliron geprüft.

Technik und Methodik.

Bakterienstämme. Die drei verwendeten Pneumococcentypen (I, II, III) wurden sämtliche von nicht mit Sulfonamid behandelten Fällen isoliert, zeigten bakteriologisch alle charakteristischen Merkmale und töteten weisse Mäuse, die mit 0,3 cc einer 18stündigen Kultur infiziert wurden, regelmässig über Nacht.

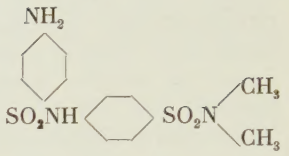
Sulfonamide. Den drei untersuchten Präparaten ist der para - amino - benzol - sulfamid - (Sulfanilamid-)Ring gemeinsam; mit diesem ist ein zweiter Ring, in welchem die Unterschiede der Präparate zum Ausdruck kommen, verbunden: Benzolsulfodimethylamid (Uliron); Pyridin (Dagénan) und Thiazol (Cibazol). Diese Sulfanilamid-Derivate haben die folgenden Konstitutionsformeln:



Uliron (Igepha).

Synonyma:

4 - (4' amino - benzolsulfonamido) - benzol-sulfone - dimethylamide.
Sulfonilyl - dimethylsulfanilamid
N'sulfanilyl - N' - N' - dimethyl - sulfonamide



Uleron

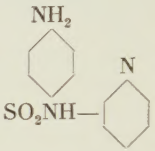
Diseptal A.

Uliron wurde in der sich im Handel befindlichen Form, d. h. in Tabletten, verwendet.

Dagénan (Specia).

Synonyma:

α (para - amino - benzène - sulfamido) - pyridine
Sulfanilamidopyridine
M & B 693
Sulfapyridin
Eubasin (um).

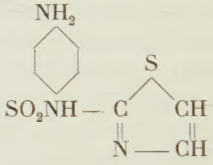


Verwendet wurde das Natriumderivat, das Soludagénan; dieses ist flüssig und enthält 0,35 g/1 cc Sulfapyridin.

Cibazol (Ciba).

Synonyma:

α (para - amino - benzène - sulfamido) - thiazol
Sulfanilamidothiazol
Sulfathiazol
Ciba 3714.



Cibazol wurde uns als Substanz und als Na-Salz in flüssiger Form zur Verfügung gestellt. 1 cc Flüssigkeit enthält 0,20 g Sulfathiazol.

Nährböden.

a) *fester Nährboden:* Kaninchenblutagarplatte (3 % Agar, 10 % frisches, defibriniertes Kaninchenblut).

Die Beimpfung der Blutagarplatte erfolgte bei jeder Passage zur Kontrolle der Reinheit und zur Wiedergewinnung des Stammes im Falle einer sekundären Verunreinigung oder einer gänzlich misslungenen Passage.

b) *flüssiger Nährboden:* Nährbouillon (Pferdefleischwasser, 1 % Fibrinpepton «Berna», 0,5 % NaCl) + 10 % *Pferdeserum* (nicht besonders inaktiviert). Die Verwendung zahlreicher, verschiedener Pferdesera verursachte gelegentlich Schwankungen im Wachstum der Bakterien, namentlich wenn von der einen Serumprobe zur andern übergegangen wurde.

Die Sulfonamidverdünnungen wurden auf verschiedene Weise hergestellt, je nachdem es sich um feste (Uliron, Cibazol) oder um flüssige (Soludagénan, Cibazol) Präparate handelte. Ueber das Vorgehen bei der Herstellung von Cibazollösungen gibt Tabelle I Aufschluss.

Jede Verdünnung wurde in einem besonderen Glasgefäss hergestellt, durch Seitz EK filtriert und in Mengen von je 5 cc in sterile Reagenzgläser abgefüllt. Zur Sterilitätsprüfung wurden die abgefüllten Proben während 24 Stunden im Thermostaten bei 37° C gehalten. Mit Ausnahme der hohen Sulfonamidkonzentrationen (100—1000 mg %), bei denen das

Tabelle I.

Verdünnungsschema für das Chemotherapeutikum (Cibazol).

Stammlösung A = 7,5 cc 20 % Cibazol + 142,5 cc Serumbouillon
Stammlösung B = 2 cc Stammlösung A + 198,0 cc Serumbouillon

	Mengenverhältnisse in cc										
Stammlösung A	100	20	10	5	2	2	—	—	—	—	—
Stammlösung B	—	—	—	—	—	—	50	20	10	5	3,5
Serumbouillon	—	80	90	95	98	198	50	80	90	5	101,5
Resultierende Sulfonamid-Konzentration in 10^{-3} cc	0,1	0,2	1	2	5	10	20	50	100	200	300
in mg %	1000	200	100	50	20	10	5	2	1	0,5	0,33

Medikament leicht ausfällt, blieben die Röhrchen klar, zeigten jedoch eine durch den Serumzusatz bedingte, leichte Opaleszenz. Bei der Verwendung der Präparate in Tablettenform musste den Ballaststoffen der Präparate Rechnung getragen werden. In diesem Fall wurden die Verdünnungen so hergestellt, dass die Substanz zunächst in Bouillon gelöst, dann bei 100—110° C sterilisiert, hierauf mit Pferdeserum versetzt und schliesslich in sterile Reagenzgläser abgefüllt wurde.

1. Festigungsversuche.

In zahlreichen Vorversuchen wurde diejenige Versuchstechnik, die weitaus die sichersten Resultate ergab, ermittelt. Dass der Ausfall von chemotherapeutischen Versuchen in vitro von der Keimmenge, mit der die Nährböden beimpft werden, in hohem Grade abhängig ist, beweisen die unterschiedlichen Angaben über die Wirksamkeit der Sulfonamide in vitro. Während es *Domagk* [4], *Rosenthal* [3] und andern Autoren nicht gelang, in vitro eine bakteriostatische Wirkung von Prontosil gegen haemolytische Streptococcen nachzuweisen, vermochten *Colebrook, Buttle und O'Meara* [1], *Nitti, Bovet und Depierre* [2] und *Wolff und Julius* [23] späterhin festzustellen, dass Sulfanilamide auch in vitro wirksam sind, sofern die Nährböden nicht mit allzu grossen Keimmengen beimpft werden. Der zu beobachtende bakteriostatische Effekt von Sulfanilamid war im allgemeinen umso stärker, je geringer die Keimaussaat bemessen wurde. Ganz ähnliche Be-

obachtungen wurden auch in Versuchen mit Pneumococcen gemacht.

In meinen Versuchen wurde daher mit mehreren Keimdichten gearbeitet, und zwar:

1. Keimdichte μ = unverdünnte 18—24stündige Kultur;
2. Keimdichte γ = Verdünnung der obigen Kultur im Verhältnis von 1 Tropfen auf 10 cc physiologischer NaCl-Lösung = ungefähre Verdünnung von 1 : 200;
3. Keimdichte Σ = Verdünnung der Keimdichte γ im Verhältnis von 1 Tropfen auf 10 cc physiologischer NaCl-Lösung = ungefähre Totalverdünnung von 1 : 40'000 bzw. 1 Tropfen = 500 Keime.

Sämtliche Röhrchen wurden mit der Pipette mit je einem Tropfen der verschiedenen Keimdichten beimpft.

Da nach den Untersuchungen von *Long, Bliss und Garret* [5] mit einem schädigenden Einfluss von physiologischer Kochsalzlösung auf stark verdünnte Pneumococcen- und Streptococcenkulturen zu rechnen ist, wurden die verschiedenen Keimverdünnungen sofort nach ihrer Herstellung auf die Nährböden überimpft. In allen Fällen, in denen dieses rasche Arbeiten nicht möglich war, wurden die Keimverdünnungen in Nährbouillon vorgenommen.

Zur Festigung der Pneumococcen wurde jeder Stamm in zwei Reihen von sulfonamidhaltigen Serumbouillon-Nährböden täglich fortgesetzt passiert, wobei die eine Reihe mit einer Keimsuspensionsverdünnung von 1 : 200 (Keimdichte γ), die andere mit einer Keimverdünnung 1 : 400'000 (Keimdichte Σ) beimpft wurden. Nach einer bestimmten Passageanzahl wurde jeweils die Konzentration des Sulfonamides im Nährboden erhöht; ergab sich hierbei, dass das Keimwachstum über mehrere Passagen nichts an Intensität einbüsste, so konnte die Angewöhnung an den höhern Gehalt des Chemotherapeutikums als gelungen betrachtet und nach einer weitern Anzahl von Passagen zu einer noch grössern Sulfonamidkonzentration übergegangen werden. War dies dagegen nicht der Fall und drohte die Festigungspassage abzureissen, so musste zu der frühern Sulfonamidkonzentration zurückgegriffen werden. Gleichzeitig mit jeder Gewöhnungspassage wurde der zu festigende Keim — zur Prüfung auf Reinheit und Wachstumsintensität und zur Reserve — noch auf zwei sulfonamidfreie Nährböden (Serumbouillon und Kaninchenblutagarplatte) überimpft. Der Originalstamm selbst wurde völlig parallel mit dem zu festigenden Stamm täglich in zusatzfreier Serum-Bouillon bzw. auf Kaninchenblutagarplatten passiert. Hierdurch war stets die Möglichkeit gegeben, den an das Chemotherapeuticum angepassten Stamm mit dem Originalstamm nach derselben Anzahl von Passagen auf seine Toleranz gegen Sulfonamid vergleichsweise zu prüfen. Die geschilderten versuchstechnischen Einzelheiten sind in Tabelle II,

Tabelle II. **Paradigma aus einer Festigungspassage**
(Pneumococcen Typ I, Cibazol)

Festigungspassagen						Passage der Stammkontr.	
	Sulfonamidgehalt der Nährböden (SB.) in mg%			Kontrollen		Kontrollen	
				Bpl.	SB.	Bpl.	SB.
27. Passage vom 6. X. 40	10	5	2	—	—		
Keimdichte Σ	+++	[+++]	+++	RK.	+++	RK.	[+++]
Keimdichte α	+++	+++	+++	RK.	+++		
28. Passage vom 7. X. 40	13,3	10	5	—	—		
Keimdichte Σ	+++	+++	+++	RK.	+++	RK.	[+++]
Keimdichte γ	+++	[+++]	+++	RK.	+++		
29. Passage vom 8. X. 40	13,3	10	5	—	—		
Keimdichte Σ	—	++	+++	RK.	+++	RK.	[+++]
Keimdichte γ	+++	[+++]	+++	RK.	+++		

Legende:
SB. = Serumbouillon
Bpl. = Kaninchenblutagarplatte
RK. = Reinkultur
−, +, ++, +++ = Wachstumsdichte nach 24 Stunden
[ ] = zur Passage verwendetes Kulturröhrchen

die einen Ausschnitt aus einer Festigungspassage von Pneumococcen des Typus I gegenüber Sulfathiazol wiedergibt, zu ersehen.

Die Fortsetzung von Dauerpassagen machte mit dem Pneumococcentyp III insofern die grössten Schwierigkeiten, als sich dieser Stamm durch sein unberechenbares Verhalten in der Kultur auszeichnete und daher nur durch relativ massive Ueberimpfung und durch gelegentliches Zurückgreifen auf die Passagekontrolle dauernd fortgezüchtet werden konnte. Erschwerend machte sich auch die unterschiedliche und nicht im voraus zu bestimmende Empfindlichkeit der drei Pneumococcenstämme gegenüber den verwendeten Chemotherapeutica geltend. Ausserdem stellten sich mit einiger Regelmässigkeit Perioden ein, während welchen die Fortzüchtung der Stämme in den sulfonamidhaltigen Nährböden aus unerfindlichen Gründen abzureissen drohte. Beobachtungen ähnlicher Art machten übrigens auch *Richet, Bachrach und Cardot* [7, 8, 9], *Jungeblut* [6] u. a. m.

Ergebnisse. Die Zunahme der Chemoresistenz erwies sich hinsichtlich ihres zeitlichen Auftretens und ihres Grades nicht nur

abhängig von der Typenzugehörigkeit der Pneumococcen, sondern auch von der Art der Sulfonamidpräparate.

Nach den ersten 12 Passagen zeigten lediglich die auf Ulironnährböden gezüchteten Pneumococcentypen I und II (Pn I und II) eine beginnende Festigung. Nach der 24. Passage hatte diese Resistenzsteigerung der Typen Pn I und II gegenüber Uliron schon deutlich zugenommen; Typ Pn II wies ausserdem bereits eine erhöhte Toleranz gegenüber Sulfapyridin und eine leicht verminderte Empfindlichkeit gegenüber Sulfathiazol auf. Dagegen wurde bei Typ Pn III noch jede Angewöhnung an die drei Sulfonamidpräparate vermisst.

Die Ergebnisse der Resistenzprüfung der Testkeime (Pn I, II und III) nach 49—69 Passagen sind in Tabelle III zusammengestellt.

Zunächst geht aus der Tabelle hervor, dass die in sulfonamid*freien* Nährböden gezüchteten Pneumococcen-Originalstämme je nach ihrer Typenzugehörigkeit eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den verwendeten Chemotherapeutica aufwiesen; die grösste Empfindlichkeit zeigte Typ II, etwas unempfindlicher verhielt sich Typ I und am resistentesten erwies sich Typ III. Diese Beobachtung ergänzt den von *Mac Leod* [22] erhobenen Befund, wonach Sulfonamide den Pneumococcentyp I besser zu beeinflussen vermögen als den Typ III.

Das Ausmass der bakteriostatischen Wirkung auf nicht gefestigte Stämme war ausserdem von der Art des Sulfonamidpräparates abhängig; den weitaus stärksten bakteriostatischen Effekt übte Sulfatiazol aus, schwächer und nahezu gleich wirksam waren Sulfapyridin und Uliron.

Aus der vorstehenden Tabelle ist nun aber vor allem ersichtlich, dass durch die fortgesetzte Züchtung von Pneumococcen in Nährböden mit sukzessiv ansteigendem Sulfonamidgehalt eine beträchtliche Gewöhnung bzw. Festigung dieser Keime gegenüber den verwendeten Sulfonamidpräparaten erzielt werden kann. Der erreichte Festigungsgrad erwies sich auch in diesem Fall als abhängig sowohl von der Typenzugehörigkeit des Bakterienstammes als auch von der Art des Sulfonamidpräparates. Für alle drei Pneumococcentypen war die Toleranzerhöhung gegenüber Uliron am ausgeprägtesten, wobei der Pneumococcentyp II den stärksten, Pneumococcentyp III den schwächsten Festigungsgrad erreichte. Gegen Sulfathiazol und Sulfapyridin konnten nur die Peumococcentypen I und II gefestigt werden, und zwar Pn I besser gegen Sulfapyridin, Pn II besser gegen Sulfathiazol. Der Pneumococcentyp III behielt dagegen seine ursprüngliche Empfindlichkeit gegen Sulfathiazol unverändert bei und zeigte merkwürdigerweise gegenüber Sulfapyridin eher eine Toleranzabnahme bzw. eine gesteigerte Empfindlichkeit. Ob dieser letztere Befund als ein

Tabelle III. **Chemoresistenz von Pneumococcen Typ I, II und III nach 49 bis 69 Festigungspassagen**

Chemotherapeutikum	Pn-Typ	Passage-No.	Stämme	Verdünnung des Sulfonamids in 10^{-3} und Konzentration des S. in mg % ( )												Wachstumstiter
				— (0)	1 (100)	1,75 (57)	2,5 (40)	5 (20)	7,5 (13,3)	10 (10)	20 (5)	50 (2)	75 (1,33)	100 (1)	200 (0,5)	
Sulfathiazol	I	59	gefest. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	±	++	+++	+++	+++	5
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	0,5
	II	69	gefest. Stamm	+++	—	—	—	—	++	++	++	+++	+++	+++	+++	13,3
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	0,5
	III	49	gefest. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	5
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	+	+++	+++	+++	+++	5
Sulfapyridin	I	58	gefest. Stamm	+++	—	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	57
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	2
	II	66	gefest. Stamm	+++	—	—	—	—	—	±	+++	+++	+++	+++	+++	10
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	++	1
	III	50	gefest. Stamm	+++	—	—	—	—	±	+	+++	+++	+++	+++	+++	13,3
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	20
Uliron	I	55	gefest. Stamm	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	⩾ 100
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	2
	II	62	gefest. Stamm	+++	+	±	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	⩾ 100
			Orig. Stamm	±	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	±	1,33
	III	51	gefest. Stamm	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	⩾ 100
			Orig. Stamm	+++	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	13,3

Der „Wachstumstiter" gibt die maximale Sulfonamid-Konzentration in mg %, bei der noch ein Wachstum der Pneumococcen erfolgte, an und ist somit der direkte Ausdruck der eingetretenen Festigung.

Phänomen von bakterieller Anaphylaxie im Sinne von *Richet* [7, 8, 9] zu deuten ist, bleibe dahingestellt.

Die eben geschilderten Verhältnisse sind in Tabelle IV, in welcher der *Festigungsindex* der einzelnen Pneumococcentypen gegenüber den drei Sulfonamiden angeführt ist, nochmals übersichtlich wiedergegeben.

Tabelle IV. **Festigungsindex während der 49. bis 69. Passage.**

	Pn-Typ I	Pn-Typ II	Pn-Typ III
Sulfathiazol	10	26	1
Sulfapyridin	29	10	< 1
Uliron	> 50	> 75	7

Festigungsindex = Quotient der erreichten und der ursprünglich tolerierten Sulfonamidkonzentration

In der Absicht, die Keimfestigung noch höher zu treiben, wurden die Gewöhnungspassagen noch über längere Zeit fortgesetzt. Bis zur 140. Passage wurde hierbei versucht, die Sulfonamidkonzentration in den Nährböden noch höher zu steigern; in der Folge begnügte ich mich, die gefestigten Stämme in Nährböden von konstant gehaltenem Sulfonamidgehalt weiter zu führen.

Welche Zunahme die Festigung der geprüften Pneumococcenstämme im Verlaufe dieser Dauerpassagen erfuhr, zeigt Tabelle V.

Aus der vorstehenden Tabelle ist ersichtlich, dass die Sulfonamidtoleranz der Pneumococcentypen I und II bis zur 140. Passage noch beträchtlich erhöht werden konnte. Die höchsten Grade von Festigung wurden wiederum gegenüber Uliron, das dem Nährboden bis zur Sättigung zugesetzt werden konnte, erzielt. Bei der Weiterzüchtung über die 200. Passage hinaus stellte sich dagegen bei beiden Typen wiederum ein höchst auffälliger Toleranzverlust ein. Ob dieses Nachlassen der Festigung von tatsächlicher Bedeutung ist oder mehr zufälligen Charakter hat, konnte indessen nicht entschieden werden. Andererseits darf als sicher angenommen werden, dass die beobachtete Festigung eine reelle ist, d. h. durch den Erwerb neuer Eigenschaften bedingt wird, wobei — wie ich mich überzeugte — die übrigen ursprünglichen Keimmerkmale (Grampositivität, kulturelles Verhalten, Gallelöslichkeit, fermentative Leistungen, Virulenz und serologische Spezifität) völlig unverändert blieben. Praktisch konstant blieb schliesslich auch die Sensibilität der auf sulfonamidfreien Nährböden gezüchteten Kontrollkulturen.

Tabelle V.

Chemoresistenz von Pneumococcen Typ I, II und III während der ganzen Versuchsdauer (ca. 200 Festigungspassagen).

Pn-Typ	Geprüft auf	Gezüchtet auf	Resistenzprüfungen								
			49.—69. Passage			134.—140. Passage			184.—217. Passage		
			Passage No.	Wachstumstiter	Festigungs-Index	Passage No.	Wachstumstiter	Festigungs-Index	Passage No.	Wachstumstiter	Festigungs-Index
I	S. Thiazol	S. Thiazol	59	5	**10**	136	200	**200**	211	50	**100**
		SB. (Kontr.)		0,5			1			0,5	
	S. Pyridin	S. Pyridin	58	57	**29**	138	333	**167**	217	100	**50**
		SB. (Kontr.)		2			2			2	
	Uliron	Uliron	55	⩾ 100	⩾ **50**	134	⩾ 1000	⩾ **200**	190	⩾ 1000	⩾ **200**
		SB. (Kontr.)		2			5			5	
II	S. Thiazol	S. Thiazol	69	13,3	**27**	138	200	**667**	216	200	**400**
		SB. (Kontr.)		0,5			0,33			0,5	
	S. Pyridin	S. Pyridin	66	10	**10**	136	333	**667**	206	500	**250**
		SB. (Kontr.)		1			0,5			2	
	Uliron	Uliron	62	⩾ 100	⩾ **75**	140	⩾ 1000	⩾ **1000**	209	⩾ 1000	⩾ **500**
		SB. (Kontr.)		1,33			1			2	
III	S. Thiazol	S. Thiazol	49	5	**1**				184	10	
		SB. (Kontr.)		5							
	S. Pyridin	S. Pyridin	50	13,3	< **1**						
		SB. (Kontr.)		20							
	Uliron	Uliron	51	⩾ 100	**7,5**						
		SB. (Kontr.)		13,3							

SB. = sulfonamidfreie Serumbouillon

Im Gegensatz zu den Pneumococcentypen I und II gelang es nicht, den Pneumococcentyp III in nennenswerter Weise gegenüber Thiazol zu festigen; die in der 184. Passage beobachtete Toleranzerhöhung liegt nämlich wohl durchaus im Bereich der Fehlergrenzen. Berücksichtigt man, dass gerade dieser Typus, der nativ durch die grösste Sulfonamidtoleranz ausgezeichnet ist, jedem Festigungsversuch widerstand und dass andererseits der a priori sulfonamidempfindlichste Typus II am leichtesten und vollständigsten gefestigt werden konnte, so drängt sich unwillkürlich die Annahme auf, dass *das Festigungsvermögen einer Keimart mit ihrer ursprünglichen Chemotoleranz im umgekehrten Verhältnis steht.*

2. Entfestigungsversuche.

Die Frage, ob die erhöhte Toleranz bzw. die Festigung der Pneumococcen gegen Sulfonamide irreversibel, d. h. als dauerhaftes Merkmal zu betrachten ist, oder ob diese Eigenschaft bei einer nachträglichen Züchtung der gefestigten Keime in sulfonamidfreien Nährböden wieder verloren geht, wurde in der folgenden Versuchsanordnung geprüft.

Sämtliche der gegen Sulfathiazol, Sulfapyridin und Uliron gefestigten Stämme wurden auf normaler, zusatzfreier Serumbouillon weitergezüchtet. Nach einer grössern Anzahl (60 bzw. 130—140) derartiger «Reversions- bzw. Entfestigungspassagen» wurde die Toleranz bestimmt, und zwar nicht nur bei dem auf Entfestigung zu prüfenden Stamm, sondern auch — vergleichsweise — bei den Originalstämmen, die stets nur auf Normal-Serumbouillon gezüchtet und den gefestigten Stämmen, die kontinuierlich auf den sulfonamidhaltigen Nährboden passiert worden waren.

Ueber den Ausfall einer derartigen Resistenzprüfung nach 55 bzw. 65 Entfestigungspassagen bei einem sulfathiazolfesten Pneumococcentyp II bzw. einem ulironfesten Pneumococcentyp I orientiert Tabelle VI.

Das Versuchsergebnis ist völlig eindeutig und kann dahin zusammengefasst werden: 1. dass der gegen Uliron gefestigte Stamm (Pn I) seine ursprünglich sehr hohe Ulirontoleranz bereits nach 65 Passagen auf sulfonamidfreien Nährböden vollständig verloren hatte. Identisch verhielt sich der ulironfeste Pn II, 2. dass eine nachweisbare Entfestigung bei dem gegen Sulfathiazol resistenten Pn II nach ungefähr derselben Anzahl von Reversionspassagen nicht beobachtet werden konnte.

Tabelle VII zeigt schliesslich, dass die sulfathiazol- bzw. sulfapyridinfesten Pneumococcenstämme Pn I und Pn II auch nach 130—140 Reversionspassagen höchstenfalls einen relativ geringfügigen Toleranzverlust (der möglicherweise nicht einmal reell ist) erlitten und sich auch — wie spätere, noch unveröffentlichte Ver-

Tabelle VI. **Prüfung auf Entfestigung nach 55 bis 65 Reversions-Passagen auf Normal-Serumbouillon**

Stamm	Geprüft auf	Anzahl der Passagen auf		Verdünnung des Sulfonamids in 10^{-3} und Konzentration des Sulfonamids in mg/% ( )												Wachstumstiter
		Sulfonamid	Normal-Serumbouillon	SB. (0)	0,1 (1000)	0,3 (333)	0,5 (200)	1 (100)	5 (20)	10 (10)	20 (5)	50 (2)	100 (1)	200 (0,5)	300 (0,33)	
S. Thiazolfester Pn II	S. Thiazol	138	—	+++	−	−	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	200
		—	ca. 138	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	++	0,33
		73	55	+++	−	−	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	200
Uliron-fester Pn I	Uliron	134	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	⩾ 1000
		—	ca. 134	+++	−	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	5
		71	65	+++	−	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	5

Tabelle VII.

Prüfung auf Entfestigung nach 130 bis 140 Reversionspassagen

Pn-Typ	Gezüchtet und geprüft auf	Anzahl der Passagen auf		Wachstumstiter
		Sulfonamid	Normal-Serumbouillon	
I	S. Thiazol	—	ca. 220	0,5
		211	—	50
		72	138	10
	S. Pyridin	—	ca. 220	2
		217	—	100
		74	132	50
II	S. Thiazol	—	ca. 220	0,5
		216	—	200
		73	138	100
	S. Pyridin	—	ca. 220	0,5
		206	—	500
		72	138	200

suche zeigten — durch weiterhin fortgesetzte Reversionspassagen in stärkerem Masse nicht entfestigen liessen.

Es besteht demnach wohl die Annahme zu Recht, dass auch die Möglichkeit der Keimentfestigung von der Art des verwendeten Sulfonamidpräparates abhängig ist, indem Keime, die gegen das bakteriostatisch schwach wirksame Uliron rasch und stark gefestigt werden konnten, ebenso leicht und rasch ihre Ulirontoleranz wieder vollständig einbüssten, wogegen Keime, deren Festigung gegen die bakteriostatisch stärker wirkenden Sulfathiazol- und Sulfapyridinpräparate nur sehr langsam eintritt, die einmal erreichte Chemoresistenz zähe beibehalten.

3. Versuche zum Nachweis einer gekreuzten Festigung.

In dieser Versuchsserie beschäftigte ich mich mit der Frage, ob die gegen ein bestimmtes Sulfonamid gefestigten Stämme auch eine erhöhte Toleranz gegen die übrigen Sulfonamidderivate aufweisen.

Zu diesem Zweck wurde jeder der gefestigten Stämme in der 60. Passage auf seine Resistenz gegenüber allen drei Sulfonamiden geprüft; die hierbei erzielten Versuchsresultate sind in Tabelle VIII wiedergegeben.

Die gegen ein bestimmtes Sulfonamid erworbene Toleranz erstreckt sich demnach auch regelmässig auf die übrigen Sulfonamidpräparate, mit denen der betreffende Stamm zuvor nicht in

Tabelle VIII.

Resistenzprüfung gefestigter Pneumococcenstämme gegenüber homologen und heterologen Sulfonamiden

Pn-Typ	Gefestigt auf	Geprüft auf	Wachstumstiter des		Festigungs-Index
			festen Stammes	Kontroll-stammes	
I	S. Thiazol	S. Thiazol	5	0,5	10
		S. Pyridin	20	2	10
		Uliron	20	2	10
	S. Pyridin	S. Thiazol	10	0,5	20
		S. Pyridin	57	2	29
		Uliron	$\geqslant$ 100	2	$\geqslant$ 50
	Uliron	S. Thiazol	5	0,5	10
		S. Pyridin	20	2	10
		Uliron	$\geqslant$ 100	2	$\geqslant$ 50
II	S. Thiazol	S. Thiazol	13,3	0,5	27
		S. Pyridin	$\geqslant$ 100	1	$\geqslant$ 100
		Uliron	$\geqslant$ 100	1,33	$\geqslant$ 75
	S. Pyridin	S. Thiazol	1,33	0,5	2,7
		S. Pyridin	10	1	10
		Uliron	20	1,33	15
	Uliron	S. Thiazol	5	0,5	10
		S. Pyridin	20	1	20
		Uliron	$\geqslant$ 100	1,33	$\geqslant$ 75
III	S. Thiazol	S. Thiazol	5	5	1
		S. Pyridin	10	13,3	$<$ 1
		Uliron	13,3	13,3	1
	S. Pyridin	S. Thiazol	2	5	$<$ 1
		S. Pyridin	10	13,3	$<$ 1
		Uliron	13,3	13,3	1
	Uliron	S. Thiazol	40	5	8
		S. Pyridin	$\geqslant$ 100	13,3	7,5
		Uliron	$\geqslant$ 100	13,3	7,5

Berührung kam. Aus der Tabelle scheint weiterhin hervorzugehen, dass die Toleranz gegenüber dem homologen, d. h. zur Festigung verwendeten Sulfonamid nicht stets am grössten ist, sondern oft gegenüber den heterologen Sulfonamiden — namentlich Uliron — den höchsten Grad erreicht. Zur genauern Abklärung dieser Frage wäre es selbstverständlich notwendig gewesen, die Konzentration

der einzelnen Sulfonamidpräparate nach ihrem Molekulargewicht im Sinne von *Feinstone, Bliss, Ott* und *Long* [23] zu eichen. Berücksichigt man jedoch, dass die Molekulargewichte von Cibazol und Dagénan nahezu dieselben sind (ca. 255 bzw. 249) und Uliron ein solches von zirka 355 aufweist, so dürfte doch die Annahme zutreffen, dass die Sulfonamidtoleranz gegen homologe und heterologe Präparate annähernd dieselbe ist; die möglicherweise festzustellenden quantitativen Unterschiede sind wohl eher auf die unterschiedlich starke bakteriostatische Wirksamkeit der einzelnen Sulfonamide zu beziehen.

Zusammenfassung

1. *Durch die fortgesetzte Züchtung von Pneumococcen in sulfonamidhaltigen Nährböden gelingt es, Stämme von hoher Toleranz gegen Sulfathiazol, Sulfapyridin und Uliron zu gewinnen.*

2. *Der erreichte Festigungsgrad erweist sich als abhängig:*

a) *von der Art des Sulfonamidpräparates; während die Festigung gegen Uliron leicht und rasch hochgetrieben werden konnte, erfolgte die Gewöhnung an Sulfathiazol und Sulfapyridin nur langsam und erreichte erst gegen die 150. Passage maximale Grade.*

b) *von der Typenzugehörigkeit der Pneumococcen. Die grösste Neigung zur Festigung zeigte Typus II; die geringste Typus III; zu diesem Verhalten steht die ursprüngliche Chemotoleranz dieser Typen im umgekehrten Verhältnis.*

3. *Pneumococcenstämme, die gegen ein bestimmtes Sulfonamid gefestigt wurden, zeigten eine entsprechend gesteigerte Toleranz auch gegenüber andern Sulfonamidpräparaten.*

4. *Bei der Keimfestigung wird eine neue Eigenschaft erworben, ohne dass die übrigen Merkmale (Färbbarkeit, kulturelles Verhalten, fermentatives Vermögen, Virulenz, serologische Spezifität) verändert werden.*

5. *Die Stabilität der chemoresistenten Keimvarianten war unterschiedlich je nach der Art des Sulfanilamides, das zur Festigung diente; ulironfeste Stämme konnten durch Züchtung auf sulfonamidfreien Nähböden rasch und vollständig entfestigt werden, wogegen sulfathiazol- und sulfapyridinresistente Stämme auch durch lange dauernde Reversionspassagen nur in geringem Grade an Toleranz einbüssten. Eine rasch zustande gekommene Festigung kann demnach anscheinend leicht rückgängig gemacht werden; durch ausgedehnte Dauerpassagen erzwungene Festigungen zeichnen sich dagegen durch einen hohen Grad von Stabilität aus.*

Literatur

[1] *L. Colebrook, G. A. H. Buttle* und *R. A. C. O'Meara:* Lancet 1936, p. 1323.
[2] *F. Nitti, D. Bovet* und *F. Depierre:* C. R. Soc. Biol. *124,* 16 (1937).
[3] *S. M. Rosenthal:* Public Health Rep. *52,* 192 (1937).
[4] *G. Domagk:* Zschr. f. Kl. Med. *132,* 775 (1937).
[5] *P. H. Long* und *E. A. Bliss:* The clinical and experimental use of sulfanilamide, sulfapyridine and allied compounds. Neuyork 1939.
[6] *G. W. Jungeblut:* Zschr. f. Hyg. *99,* 254 (1923).
[7] *C. Richet, E. Bachrach* und *H. Cardot:* C. R. Acad. Sci. *172,* 1554 (1921).
[8] *C. Richet, E. Bachrach* und *H. Cardot:* C. R. Acad. Sci. *172,* 512 (1921).
[9] *C. Richet* und *H. Cardot:* C. R. Acad. Sci. *171,* 1353 (1920).
[10] *W. H. Feinstone, E. A. Bliss, E. Ott* und *P. H. Long:* Bull. Johns Hopkins Hosp. *62,* 565 (1938).
[11] *J. Morgenroth:* Zbl. Bakt. I, Orig. *93,* 94 (1925).
[12] *E. Gotschlich:* Zbl. Bakt. I, Orig. *93,* 2 (1925).
[13] *H. Felke:* Klin. Wschr. 1938, p. 13.
[14] *H. Felke:* Klin. Wschr. 1939, p. 568.
[15] *G. Miescher* und *A. Schnetz:* Schweiz. med. Wschr. 1941, p. 175.
[16] *H. Spitzer:* Inaugural-Dissertation Zürich (im Druck).
[17] *R. W. Ross:* Lancet 1939, p. 1207.
[18] *C. M. Mac Leod* und *G. Daddi:* Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. *41,* 69 (1939).
[19] *C. M. Mac Leod:* Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. *41,* 215 (1939).
[20] *L. H. Schmidt, C. E. Claugus* und *E. Starkes:* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. *45,* 256 (1940).
[21] *L. Westphal, R. L. Charles* und *C. M. Carpenter:* J. Bact. *39,* 47 (1940).
[22] *C. M. Mac Leod:* J. amer. med. Assoc. *113,* 1405 (1939).
[23] *L. K. Wolff* und *H. W. Julius:* Ann. Inst. Pasteur *62,* 616 (1939).